

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670402

研究課題名(和文)簡便、低侵襲に心不全重症度を可視化・定量可能な動物モデルの開発

研究課題名(英文)Development of simple and noninvasive method to assess the severity of heart failure

研究代表者

高島 成二 (Takashima, Seiji)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：90379272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナトリウム利尿ペプチド(ANPおよびBNP)は、心不全時に心臓より分泌されるペプチド性生理活性物質である。その利尿作用等は心不全の改善に働くと考えられており、その製剤は心不全治療薬としてすでに臨床で頻繁に使用されている。本研究では長年謎であった心不全におけるナトリウム利尿ペプチドの発現を調整する仕組みを明らかにした。同時にこの現象を利用して心不全の重症度を無侵襲で定量化する技術を開発した。今後この活性化メカニズムの検討により新たな心不全の病態解明および治療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Natriuretic peptides (ANP and BNP) are physiologically active substances secreted from the heart during heart failure. Their diuretic function works on the improvement of heart failure. Both ANP and BNP have already been frequently used in clinical heart failure as therapeutic agents. In this study we revealed a mechanism for adjusting the expression of natriuretic peptides in failing heart. At the same time, we developed a technique for quantifying severity of heart failure by utilizing this phenomenon. Establishment of the pathogenesis and treatment of heart failure is expected by the study in the future.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 利尿ホルモン モデル動物

1. 研究開始当初の背景

発光基質を生体内でも鋭敏に観察することが可能である In Vivo Live Imaging System (IVIS) は生体内のリアルタイム遺伝子発現定量を可能とするようになった。この IVIS を利用して、病態特異的遺伝子の発現が経時的・リアルタイムに評価可能な動物モデルを作成できる可能性が考えられた。心不全においては様々な適応タンパク質が発現することが知られているが、いまだ心不全病態特異的エンハンサーは未同定のまま残されている。また、一般心不全に比し最重症心不全に対する薬剤満足度は低い。低侵襲・簡便に心不全病態形成を知る動物モデルの開発は創薬研究において重要性を増すことが予想される。

2. 研究の目的

低侵襲に繰り返し病態評価が可能な心不全モニタリングマウスを開発を行うことを目的とする。既に、モニタリングに使用する心不全感受性遺伝子エンハンサーの同定に成功している。このエンハンサーを利用して心不全の重症度を外部から発光測定により定量可能なマウスの作成を試みる。成功すればさまざまな循環器病研究に利用される普遍的・標準的な心不全重症度の定量可視化モデルとなると期待される。

3. 研究の方法

(1) 新規同定した心不全病態感受性エンハンサーの高感受性領域への絞り込み

心不全感受性遺伝子 BNP の発現調節を担うエンハンサー領域を、まずエピゲノムマーカー等を指標に 9 つの部位 (CR1 ~ CR9) に絞り込み、その中から最も反応性のよい領域を同定した。同領域は BNP 遺伝子の 10kb 以上も上流に存在し、種間を超えて高い保存性を有していた。本研究では、さらに反応部位の狭小化・高感度化を進め

る。

超微量蛋白の単離精製/質量分析など研究室独自に連結された分子探索システムを有している (Nakano, Takashima. Nat Cell Biol 2010)。これらを、利用して同定されたエンハンサー領域に結合するアクチベーターを単離同定する。

同アクチベーターに対する抗体と不全心を用いた ChIP-seq 解析を行い、アクチベーターの発現標的である心不全病態関連因子を検索する。

(2) 病態特異的心臓レポーター遺伝子発現系による生体ライブイメージングモデルの開発

昨年度までに、CR9 を含む発現ベクターを用いた予備的検討を行い、マウス受精卵導入によるキメラマウスを作成し、ライン化を行った。結果心臓特異的に発現するとともに、生体マウスへのルシフェリン投与により外部からの発光測定が可能なことを確認した。さらにその発現量は内因性 BNP 発現と強く相関すること、また発光測定によりレポーター遺伝子の発現量を定量できることが確認された。本研究では CR9 により規定される 650bp をさらに絞り込む。そして、高感受性領域 (配列仮称 HSCS9) を用いた新たなトランスジェニックマウス系統を樹立して、本アッセイ系の高感度化を目指す。

樹立した HSCS9-マウスラインを用いて、レポーター遺伝子と内因性 BNP 遺伝子の発現相関性、心臓特異性、臓器間比較による定量性を検証し、さらに各種心不全負荷 (フェニレフリン投与、大動脈縮搾モデル、心筋梗塞モデル、心筋症モデル) を行い、心不全モニタリングモデルとしての普遍性を検証する。

4. 研究成果

ナトリウム利尿ペプチドの発現誘導を行う領域を当該遺伝子からかなりはなれた部位にエンハンサーとして同定した。さらに、その領域を 120bp まで狭小化し、生体内での役割を解明した。すなわち心不全の重症度によってこのエンハンサー活性が高い相関をもって上昇することを明らかにした。さらにこのエンハンサーにルシフェラーゼを付け遺伝子導入したマウスを作製し、心不全重症度を簡便、低侵襲に経時観察可能なマウスアッセイ系を確立した。本マウスに関する特許(非公開)は大阪大学が承継して出願し、複数の製薬企業から心臓毒性のモニターマウスとして使用の打診を受けている。さらに、このエンハンサーの結合タンパク質のスクリーニングの開始とともにエンハンサー作動性化合物のスクリーニングも開始された。

以上より挑戦的研究段階は終了し、27 年度引き続き基盤研究として本研究内容は継続されることとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

全て査読有。

1. Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto YI, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, **Takashima S**. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 3;112(5):1553-8.(2015)
doi: 10.1073/pnas.1419767112.

2. Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, **Takashima S**. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5.

Nat Commun. 6: 6137. (2015)

doi: 10.1038/ncomms7137.

3. Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, **Takashima S**, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A, Imamura H. Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca²⁺ influx and subsequent Ca²⁺ oscillations.

J Biol Chem. 289(4): 2205-16. (2014)

doi: 10.1074/jbc.M113.499111.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高島 成二 (TAKASHIMA SEIJI)

大阪大学大学院生命機能研究科

教授

研究者番号 : 90379272

(2)研究分担者

朝野 仁裕 (ASANO YOSHIGIHIRO)

大阪大学医学系研究科

研究者番号 : 60527670

(3)連携研究者

塚本 蔵 (TSUKAMOTO OSAMU)

大阪大学医学系研究科

研究者番号 : 80589151

(4)連携研究者

肥後 修一郎 (HIGO SHUICHIRO)

大阪大学医学系研究科

研究者番号：00604034

